

고분자 코팅을 이용한 경구용 리포솜의 개발 (I): 다당체로 코팅된 리포솜의 담즙산염에 대한 안정성

최영욱[†] · 한양희

중앙대학교 약학대학

(1992년 8월 27일 접수)

Polymer-Coated Liposomes for Oral Drug Delivery (I): Stability of Polysaccharide-Coated Liposomes Against Bile Salts

Young Wook Choi and Yang Hee Hahn

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received August 27, 1992)

Stabilization of liposomes against degradation by bile salts has been investigated in order to develop a liposomal model system for oral drug delivery. Two polysaccharides, amylopectin (AP) and chitin (CT), were employed to coat both empty liposomes and bromthymol blue (BTB)-encapsulated liposomes by adsorption-coating techniques. Turbidity changes and BTB-release characteristics in pH 5.6 buffer solutions with or without bile salts, sodium cholate and sodium glycocholate, were observed to compare the differences between uncoated liposomes and polysaccharide-coated liposomes. Initial turbidities of both uncoated and polysaccharide-coated liposomes in buffer solution were kept constant within 3% range during 4 hours of experiments. But they were decreased in a different manner in bile salts-containing buffer solutions, showing 10% or less decrease for polysaccharide-coated liposomes and 25% or more decrease for uncoated liposomes. BTB release from uncoated liposomes has been greatly increased upto 90% after 4 hours in bile salts-containing buffer solution, which is a clue for breakdown of liposomal vesicles. However, polysaccharide-coated liposomes showed the controlled-release pattern which is proportional to square-root of time, followed by around 50% release for the same time period. Consequently, it is possible to conclude that these polysaccharide-coated liposomes might be an available system for oral delivery of a drug which is unstable in gut environment.

Keywords—Liposomes, Oral delivery, Polysaccharide-coating, Stability, Turbidity, Bile salts.

리포솜내에 수용성 또는 지용성 약물을 봉입시켜 생체에 적용할 수 있는 약물전달시스템을 개발하기 위한 노력은 그동안 끊임없이 경주되어 왔으며, 특히 근래에는 효소, 항암제, 항염증스테로이드, 펩타이드 약물의 전달시스템으로서 리포솜을 응용한 예가 광범위하게 보고되고 있다.¹⁻⁸⁾ 이들 대부분은 투여경로로서 정맥주사에 의존하고 있는데, 그 이유는 이러한 약물들이 경구투여 될 경우 위장관내에서 분해되거나 잘 흡수되지 않기 때문인 것으로 알려져

있다.

경구투여시 분해되기 쉽거나 위장관으로부터 흡수되기 어려운 약물들을 리포솜내에 봉입시키므로써 경구적으로 약물을 전달하기 위한 연구가 1970년대 중반이후 많이 보고되어 왔으나, 위장관내의 생리 환경으로부터 방어막으로서의 리포솜이 봉입된 약물을 충분히 보호해 주지 못하고 리포솜 자체가 가지는 불안정성으로 인하여 아직도 유의성있는 결과를 별로 얻고 있지 못한 실정이다.⁹⁻¹¹⁾ 소화관내의

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

pH 및 소화효소는 가장 큰 영향을 줄 수 있는 요인들인데 그 중 소화효소에 대한 불안정성은 보다 큰 문제점으로 지적되고 있다. 예로서 인슐린을 48% 봉입시킨 포스파티딜콜린/콜레스테롤/스테아릴아민(7:2:2.5 몰비) 리포솜의 경우 펩신 존재하 pH 1.2의 강산성에서 봉입된 약물을 거의 손실없이 보호할 수 있었으나, 담즙산염에는 매우 민감하여 2배 이상 희석된 담즙산염 용액에서 37°C에서 3시간 저장했을 때 봉입된 인슐린이 모두 소실되었다.¹²⁾

담즙산염은 주로 콜린산 및 그 염, 타우로콜린산 및 그 염, 글리코콜린산 및 그 염, 데속시콜린산 및 그 염 등의 혼합물로 되어 있는데, 이들 담즙산류들은 인지질을 유화시키고 리포솜막의 유동성을 변화시켜 리포솜막의 구조적 완전성(structural integrity)을 파괴하는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 따라서, 리포솜을 경구용 약물 수송체로 개발하기 위해서는 이들 담즙산류들에 대한 안정화가 가장 먼저 해결되어야 할 과제이다. 리포솜막을 안정화하는 방법에 대해서는 현재까지 많은 연구결과가 발표되었는데,¹³⁻²⁵⁾ 고분자 골격구조를 도입하여 리포솜막의 표면을 변조하는 방법이 가장 긍정적으로 받아들여지고 있다. 특히 그 중에서도 가장 많이 이용되고 있는 방법으로서, 수용성 고분자를 친수성 또는 이온결합에 의해 리포솜 표면에 흡착시키는 방법과²⁰⁻²²⁾ 수용성 고분자를 지방산등과 반응시켜 소수성 고정기(hydrophobic anchor group)를 도입하고 이것을 리포솜막의 내부에 결합시키는 방법²⁵⁾ 등이 있다.

본 연구에서는 전자의 방법 즉, 흡착원리에 의해 다당체로 코팅된 리포솜을 제조하였으며, 먼저 담즙산염 용액에서의 탁도변화를 측정하여 물리적인 안정성을 관찰하였고, 또 marker로서 수용성 색소를 리포솜내에 봉입시킨 뒤 완충액 및 효소용액에서의 방출특성을 관찰하였다.

실험 방법

재료 및 기기

인지질로서 dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)로 약함), 다당체로서 아밀로펙틴(AP로 약함)과 키틴(CT로 약함), 담즙산염으로서 콜린산나트륨 및 글리코콜린산나트륨, marker로서 브롬치몰블루(BTB

로 약함)를 각각 사용하였는데 이들은 모두 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 그대로 사용하였다. 기타 일반시약은 시판 E.P.급을 사용하였으며, 사용된 기기로서는 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co.), 가시부 분광광도계(model UV-240, Shimadzu), 초원심분리기(model L8-55, Beckman), incubator(model I.B.122, 삼화공사) 등을 이용하였다.

다당체로 코팅된 리포솜의 제조

다당체로 코팅된 리포솜은 먼저 일반적인 제조방법에 따라 만든 리포솜을 흡착 코팅의 원리에 의해 다당체 용액에 일정시간 incubation 하여 제조하였다. DMPC의 클로로포름 용액을 감압농축 시켜 둥근바닥 플라스크의 기벽에 얇은 인지질막을 형성시키고 질소가스로 처리한 다음 진공건조기에 하룻밤 방치하여 잔류하는 휘발성 물질을 모두 제거시킨 뒤 40°C의 수욕상에서 미리 준비한 pH 5.6 인산염완충액(이하 완충액으로 약함)을 건조된 인지질막에 가하고 5분간 vortex-혼합하여 MLV리포솜(인지질 농도로서 500 μM)을 얻었다. 얻어진 대조용(비코팅) 리포솜을 CT 및 AP 1% 용액에 각각 분산시켜 실온에서 교반하면서 24시간 방치하여 CT- 및 AP-코팅된 리포솜을 얻었다.

탁도측정실험에서는 이들 다당체로 코팅된 리포솜들을 더 이상의 정제과정 없이 그대로 사용하였으며 BTB 방출실험에서는 다음과 같이 겔여과하여 사용하였다. 즉, 지표물질(marker)로서 BTB를 10 mM로 녹인 완충액을 사용하여 이와 동일한 방법에 의해 비코팅 BTB-봉입 리포솜, CT-코팅된 BTB-봉입 리포솜, AP-코팅된 BTB-봉입 리포솜을 얻고 겔여과 칼럼(Sephadex G-25, 1.6×70 cm)을 통과시켜 유리된 BTB를 제거하였다.

탁도 측정

다당체로 코팅된 리포솜의 담즙산염에 대한 물리적 안정성을 평가하기 위해 완충액 및 담즙산염 일정농도 용액에서 정해진 시간별로 탁도의 변화를 측정하였다. 전술한 바와 같이 먼저 약물이 봉입되지 않은 리포솜을 만들어 대조용 리포솜으로 하고, 이 리포솜액 3 ml에 완충액 및 담즙산염 2~5 mM 용액 각각 3 ml를 가하여 최종인지질 농도로서 250 μM, 최종 효소농도로서 1~2.5 mM로 하였다. 이들 시험액을 37°C에서 보관하면서 정해진 시간별로 400 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식(1)에 의해 상

대적 탁도(relative turbidity)를 구하였다.

$$\text{Relative Turbidity} = A/A_0 \quad (1)$$

여기서 A_0 는 효소의 작용을 받지 않은 상태에서의 초기 흡광도이며, A 는 주어진 실험조건에서 각 측정시간에서의 흡광도이다. 한편 CT-코팅된 리포솜 및 AP-코팅된 리포솜에 대해서도 위와 동일한 방법으로 탁도를 관찰하였으며, 3회 이상의 실험치로부터 평균값을 구하였다.

BTB의 방출

리포솜에 약물이 봉입되었을 경우 다당체코팅이 봉입된 약물의 방출에 미치는 영향과 효소 존재시 리포솜의 불안정성에 따른 약물방출 특성을 알아보기 위해, 지표물질로서 수용성 색소인 BTB가 봉입된 비코팅 BTB-봉입 리포솜 뿐만 아니라 앞에서 얻은 CT-코팅된 BTB-봉입 리포솜 및 AP-코팅된 BTB-봉입 리포솜을 대상으로 하였다. 각각의 현탁액 3 ml에 완충액 및 일정농도의 담즙산염 용액 3 ml를 각각 가하고 37°C에서 일정시간 보관한 후, 25,000 Xg로 원심분리하여 리포솜을 침전시키고 상정액 4 ml를 취하여 가시부 분광광도계로 615 nm에서 BTB의 농도를 정량하였으며, 봉입된 BTB의 방출 정도는 다음 식 (2)에 의하여 구하였다.

$$\text{Degree of release}(\%) = (B - B_0)/(B_t - B_0) \times 100 \quad (2)$$

여기서 B_0 는 효소의 작용을 받지 않은 초기의 BTB농도이며, B 는 주어진 실험조건에서 각 측정시간에서의 BTB농도이고, B_t 는 총 BTB농도이다. 한편, 각기 다른 농도의 담즙산염 용액에서 일정시간 후의 방출 현상도 이와 동일한 방법으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

비코팅 리포솜의 탁도변화

먼저 대조용(비코팅) 리포솜의 물리적 안정성을 알아보기 위해, 각 실험조건에서의 시간 경과에 따른 탁도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 담즙산염을 함유하지 않은 완충액에서 리포솜은 초기의 탁도를 그대로 유지하여 4시간 동안 관찰하였을 때 ±3% 이내의 범위에서 거의 일정한 상대적 탁도를 나타내었으나, 담즙산염을 함유한 각 시험액에서는

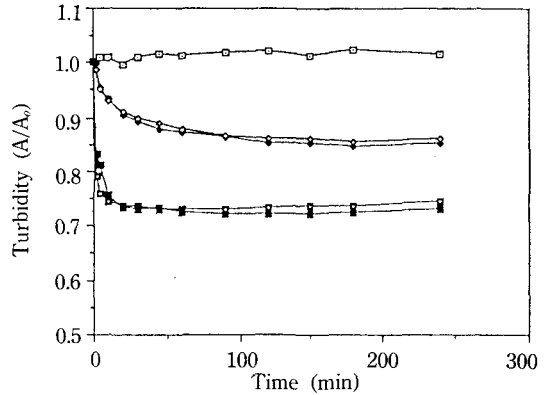


Figure 1—Turbidity changes of uncoated liposomes in various dispersion medium of pH 5.6 buffer solution: -□-, buffer alone; -◆-, sodium cholate 1.5 mM; -■-, sodium cholate 2.5 mM; -◇-, sodium glycocholate 1.0 mM; -■-, sodium glycocholate 2.0 mM

30분을 전후하여 급격한 탁도의 감소를 나타내므로서 리포솜의 담즙산염에 대한 불안정성을 확인할 수 있었다. 콜린산염 및 글리코콜린산염의 농도가 높아질수록 탁도변화는 더 크게 나타났고 감소경향도 더 빨라서, 콜린산염 1.5 mM 및 글리코콜린산염 1.0 mM에서 30분 이내에 약 10%의 감소를 보인 반면, 각각 2.5 mM 및 2.0 mM에서는 10분 이내에 20%가 감소하였고 30분에는 약 25%의 감소를 보여 주었다.

이러한 결과는 담즙산염들이 리포솜 소포체(vesicle)들을 용해 또는 파괴시키므로서 탁도를 감소시킨다는 일반적인 보문들^{10,26)}과 일치하는 것으로서, 다음 단계 실험으로서 다당체 코팅이 리포솜 소포체들을 얼마나 안정화할 수 있는가에 대한 평가방법으로서의 충분한 근거를 제시해 주었다. 한편, 글리코콜린산염은 콜린산염에 비해 0.5 mM 더 작은 농도에서 콜린산염과 같은 정도의 리포솜 파괴능력을 나타내므로서, 담즙산염의 글리신 복합체가 일반적으로 분자수식되지 않은 담즙산염보다 인지질 막을 교란시키는 능력이 크다는 사실²⁶⁾을 뒷받침하고 있다.

다당체로 코팅된 리포솜의 탁도변화

앞에서와 같은 대조용 리포솜에 대한 담즙산염 용액에서의 불안정을 토대로 하여, 리포솜의 표면을 다당체로 코팅하고 그에 따른 각 실험조건에서의 탁도변화를 관찰하므로서 다당체로 코팅된 리포솜들이 훨씬 더 안정함을 알 수 있었다(Fig. 2 및 3).

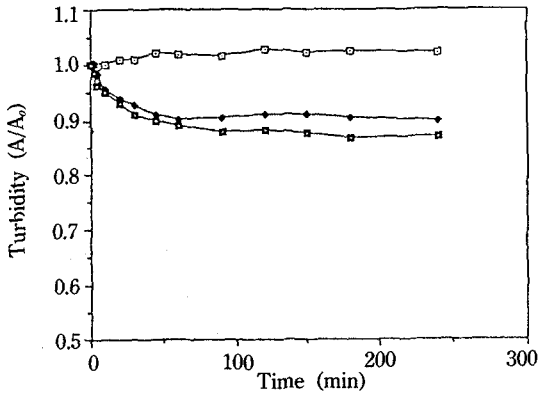


Figure 2—Turbidity changes of amylopectin-coated liposomes in various dispersion medium of pH 5.6 buffer solution: -□-, buffer alone; -◆-, sodium cholate 2.5 mM; -■-, sodium glycocholate 2.0 mM

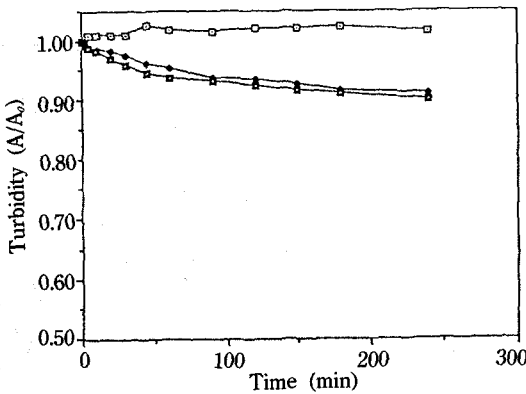


Figure 3—Turbidity changes of chitin-coated liposomes in various dispersion medium of pH 5.6 buffer solution: -□-, buffer alone; -◆-, sodium cholate 2.5 mM; -■-, sodium glycocholate 2.0 mM

리포솜의 다당체 코팅은 Takada 등²⁰⁾이 보고한 방법과 같이 하였는데, 만들어진 일반 리포솜을 고분자용액에 재분산시켜 일정시간동안 교반하므로써 고분자를 리포솜막에 흡착코팅 시켰으며, 더 이상의 처리과정없이 그대로 탁도를 측정하였다. 즉, 코팅된 리포솜을 전자현미경으로 관찰하였을 때 일반 리포솜과 큰 차이점을 관찰할 수 없었고 과잉 존재할 수 있는 다당체는 탁도의 변화에 아무런 영향을 주지 않았으므로, 코팅 효율 등의 측정없이 혼합된 상태에서 그대로 사용하였다.

다당체로 코팅된 리포솜들 역시 완충액에서는 거의 탁도 변화가 없었으나, 담즙산염 용액에서는 3~4

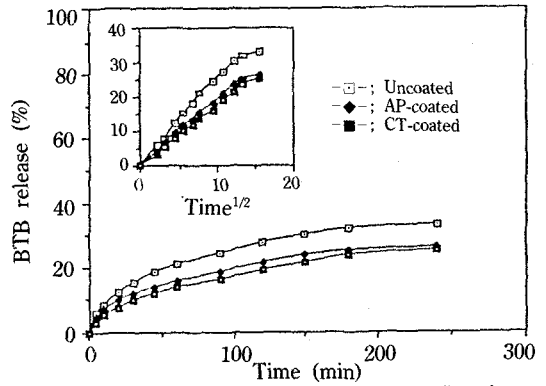


Figure 4—Bromthymol blue (BTB) release profile of uncoated, amylopectin (AP)-coated, and chitin (CT)-coated liposomes in pH 5.6 buffer solution

시간에 걸쳐 약 10% 이내의 탁도감소를 보여주었다. 이것은 같은 조건에서 대조용 리포솜이 약 25% 이상의 감소를 나타낸 것에 비하여 볼때, 안정성의 개선에 충분한 가치가 있다고 판단되지만 앞으로는 다당체나 기타 고분자물질의 선택과 함께 코팅조건의 최적화 등을 통하여 좀 더 개선해야 할 여지가 남아있다고 사료된다. 예로서, CT-코팅된 리포솜은 AP-코팅된 리포솜에 비하여 담즙산염용액에서 보다 안정하였다. AP-코팅된 리포솜이 60분 이내에 10%의 감소를 보인 반면에 CT-코팅된 리포솜은 60분 경과시 약 5~6%의 감소를 나타내므로써, 키틴이 아밀로펙틴에 비하여 담즙산염의 파괴작용을 보다 효과적으로 지연시켰음을 알 수 있었다.

BTB방출에 미치는 다당체코팅의 영향

약물을 봉입하지 않은 빈 리포솜에 대해서는 전술한 바와같이 탁도의 변화를 측정하므로써 그 안정성을 비교할 수 있었으나, 리포솜에 약물이 봉입되었을 경우 다당체 코팅이 봉입된 약물의 방출특성에 미치는 영향을 알아보기 위해 완충액 및 담즙산염용액에서의 BTB방출현상을 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 4~6과 같다. 수용성 색소인 BTB의 봉입시 봉입되지 않은 유리 BTB는 Sephadex칼럼을 통해 분리 제거하고, 따로 리포솜 분획을 취하였다.

먼저 효소를 함유하지 않은 완충액에서의 방출특성을 보면(Fig. 4), 리포솜막은 봉입된 BTB에 대하여 방출제어기능을 나타내어 4시간까지 관찰하였을 때 비코팅 리포솜은 33%, AP-및 CT-코팅된 리포솜들은 약 25%의 BTB방출을 나타내었으며, 증가하는 경

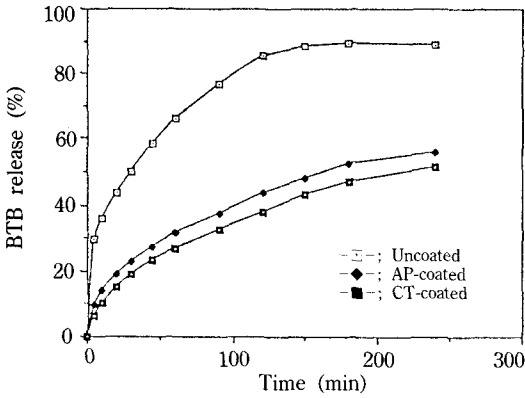


Figure 5—Bromthymol blue (BTB) release profile of uncoated, amylopectin (AP)-coated, and chitin (CT)-coated liposomes in 2.5 mM of sodium cholate containing buffer solution

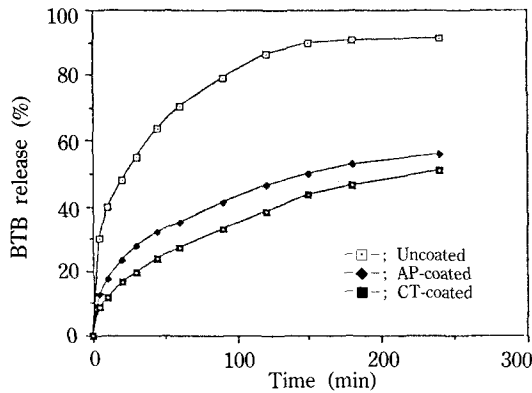


Figure 6—Bromthymol blue (BTB) release profile of uncoated, amylopectin (AP)-coated, and chitin (CT)-coated liposomes in 2.0 mM of sodium glycocholate -containing buffer solution

향도 매우 유사하였다. 이것을 시간의 제곱근에 따른 방출량으로서 나타낸 결과, Fig. 4에 삽입된 축소그라프에서 볼 수 있는 바와같이, 세가지 리포솜 모두 직선관계가 성립하므로써, 비코팅 및 다당체 코팅된 리포솜으로부터 BTB방출특성은 Higuchi식에 따른 매트릭스형의 확산 모델²⁷⁾임을 알 수 있었다. 이것은 리포솜 소포체의 인지질막이 완전한 구조성을 가진 단순고정확산막으로서의 기능을 나타내지 않고, 비교적 유동성이면서 동시에 방출제어기능을 가진 유동성의 반투과막이기 때문인 것으로 해석된다. 또한, 다당체코팅은 리포솜으로부터의 BTB방출을 다소 저하시키기는 하였으나 위와같은 방출특성에는 별

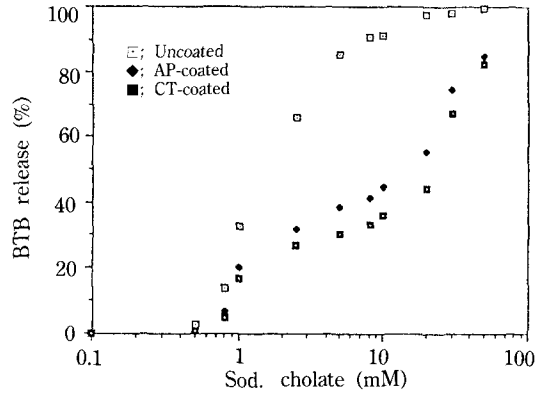


Figure 7—Plot of bromthymol blue (BTB) release from different liposomes versus sodium cholate concentrations

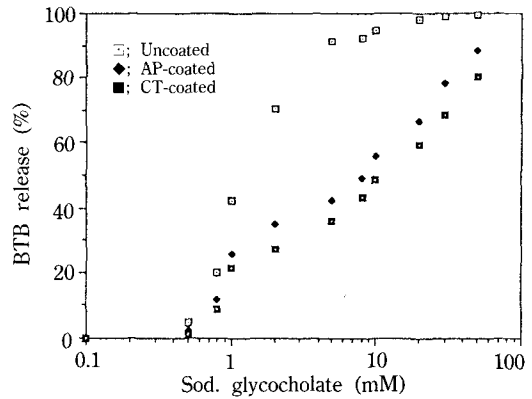


Figure 8—Plot of bromthymol blue (BTB) release from different liposomes versus sodium glycocholate concentrations

다른 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.

한편, 담즙산염용액에서의 BTB방출특성을 보면 (Fig. 5 및 6), 비코팅 리포솜의 경우 4시간 경과시 약 90%에 이르는 BTB방출을 보였을 뿐만 아니라 초기의 급격한 방출증가로 인하여 Higuchi식에 벗어났지만, AP- 및 CT-코팅된 리포솜들은 4시간 까지 평균적으로 50~55%의 방출을 보이면서 서서히 증가하여 Higuchi식에 따르는 방출특성을 간직하고 있었다. 따라서 이들 다당체로 코팅된 리포솜들은 비록 담즙산염의 리포솜막 교란작용을 완전히 차단하지는 못했으나, 최소한 내부에 봉입한 약물의 방출을 제어함과 동시에 리포솜막 자체의 방출특성을 유지시켜 주는 것으로 판단되었다.

담즙산염 농도에 따른 BTB 방출 특성

앞에서는 일정농도의 담즙산염 용액에서 시간 경과에 따른 BTB의 방출특성을 살펴보았으나, 임의의 특정시간에서의 담즙산염 농도에 따른 세가지 리포솜들의 BTB 방출현상을 관찰하므로써 이들 간의 상대적 안정성을 비교할 수 있기 때문에 완충액 및 각 담즙산염용액을 가하고 1시간 후에 있어서의 방출특성을 Fig. 7 및 8에 나타내었다. 콜린산염 및 글리코콜린산염 용액 모두에서 비코팅 리포솜은 효소농도 1~5 mM에서 매우 불안정하여 85~90%까지 급격한 BTB방출 증가를 나타낸 반면, AP- 및 CT- 코팅된 리포솜들은 같은 효소 농도에서 평균적으로 40% 이하의 방출을 보이다가 각 효소농도 10 mM 부근에서부터 방출이 증가되는 경향을 나타내었다. 따라서 효소농도의 증가에 대한 리포솜들의 불안정성 측면에서 비교해 볼때, 다당체로 코팅된 리포솜들은 비코팅 리포솜에 비하여 한 차원 높은 안정성을 가지는 것으로 해석할 수 있었다. 한편 글리코콜린산염용액에서의 다당체로 코팅된 리포솜들의 BTB방출 증가가 콜린산염 용액에서의 방출증가보다 더 크게 나타나므로써 글리코콜린산염이 콜린산염보다 리포솜 파괴능력이 더 큰 것을 확인할 수 있었고, 이것은 앞의 탁도 변화 측정 결과와도 잘 일치하였다.

결 론

경구용 약물 수송체로서의 리포솜 개발을 목표로 아미로펙틴(AP) 및 키틴(CT)으로 코팅된 리포솜을 먼저 제조하고 이들의 위장관내 안정성을 검토하기 위해 우선 일차적으로 담즙산염용액에서의 안정성을 평가하는 것이 본 연구의 목적이었다. 평가 방법으로는 약물을 봉입하지 않은 리포솜의 탁도변화를 관찰 하는 것과 지표물질로서 수용성 색소인 브롬치몰블루(BTB)를 봉입시킨 리포솜으로부터의 BTB 방출 특성을 관찰하는 것이 주된 실험 대상이었다.

탁도 측정실험에서는 비코팅 리포솜이 담즙산염의 작용을 받아 급격한 탁도의 감소를 보인 반면에 AP- 및 CT-코팅된 리포솜들은 같은 조건에서 3시간 이상 관찰했을 때 상대적으로 안정함을 알 수 있었다. 효소를 함유하지 않은 완충액에서 비코팅 및 다당체로 코팅된 리포솜들로부터의 BTB방출량은 시간의

제공근에 비례하여 증가하였으며, 비코팅 리포솜은 담즙산염 용액에서 이와 같은 특성에서 벗어나 초기에 급격한 방출증가를 보인 반면에 다당체로 코팅된 리포솜들은 원래의 방출특성은 그대로 유지하면서 BTB의 방출을 다소 저하시킴을 알 수 있었다.

결론적으로, 다당체로 코팅된 리포솜은 콜린산염 및 글리코콜린산염 용액에서 비코팅 리포솜에 비하여 비교적 안정하였으며 봉입된 약물을 지속적으로 방출하므로써 향후 경구용 리포솜의 개발에 밝은 전망을 줄 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) H.M. Patel and B.E. Ryman, Systemic and oral administration of liposomes. In C.G. Knight(Ed.), *Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1981, chap. 5.
- 2) M. Emmelius, G. Hoerpel, H. Ringsdorf, and B. Schmidt, Polymeric micelles and liposomes as potential drug carriers. *Polym. Sci. Technol.*, **34**, 313 (1986).
- 3) X.H. Zhou and A. Li Wan Po, Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration. *Int. J. Pharm.*, **75**, 97 (1991).
- 4) C.A. Gilligan and A. Li Wan Po, Oral vaccines: Design and delivery. *Int. J. Pharm.*, **75**, 1 (1991).
- 5) J. Holmgren and N. Lycke, Immune mechanisms in enteric infections. In J. Holmgren, A. Lindberg, and R. Mollby (Eds.), *Development of vaccines and Drug against Diarrhoea*, *Studentlitteratur*, Lund, 1986, pp.9-22.
- 6) R.L. Owen and A.L. Jones, Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, **66**, 189 (1974)
- 7) M.C. Sneller and W. Strober, M cells and host

- defence. *J. Infect. Dis.*, **154**, 737 (1986).
- 8) R.I. Walker and R.L. Owen, Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Annu. Rev. Med.*, **41**, 393 (1990).
 - 9) R.N. Rowland and J.F. Woodley, The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 400 (1980).
 - 10) M.H. Richards and C.R. Grardneer, Effects of bile salts on the structural integrity of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **543**, 508 (1978).
 - 11) J.A.F. Op Dem Kamp, J. De Gier, and L.L.M. Deenen, Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A₂ at the transition temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 253 (1974).
 - 12) A. Hashimoto and J. Kawada, Effects of oral administration of positively charged insulin liposomes on alloxan diabetic rats; preliminary study. *Endocrinol. Jpn.*, **26**, 337 (1979).
 - 13) R.L. Juliano, M.J. Hsu, S.L. Regen, and M. Singh, Photopolymerized phospholipid vesicles: stability and retention of hydrophilic and hydrophobic marker substances. *Biochim. Biophys. Acta*, **770**, 109 (1984).
 - 14) R. Neumann, H. Ringsdorf, E.V. Patton, and D.F. O'Brien, Preparation and characterization of long chain amino acid and peptide vesicle membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **898**, 338 (1987).
 - 15) D.S. Johnston, S. Sanghera, A. Manjon-Rubio, and D. Chapman, The formation of polymeric model biomembranes from diacetylenic fatty acids and phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 213 (1980).
 - 16) R. Neumann and H. Ringsdorf, Peptide liposomes from amphiphilic amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 487 (1986).
 - 17) S.L. Regen, J.S. Shin, and K. Yamaguchi, Polymer-encased vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2446 (1984).
 - 18) H. Fukuda, T. Diem, J. Stefely, F.J. Kezdy, and S.L. Regen, Polymer-encased vesicles derived from diocadecyldimethylammonium methacrylate. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2321 (1986).
 - 19) A.E. Gad, G. Elyashiv, and N. Rosenberg, The induction of large unilamellar vesicle fusion by cationic polypeptides: the effects of mannitol, size, charge density and hydrophobicity of the cationic polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 314 (1986).
 - 20) M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayama, K. Iwamoto, and J. Sunamoto, Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 237 (1984)
 - 21) J. Moellerfeld, W. Prass, H. Ringsdorf, H. Hamazaki, and J. Sunamoto, Improved stability of black lipid membranes by coating with polysaccharide derivatives bearing hydrophobic anchor groups. *Biochim. Biophys. Acta.*, **857**, 265 (1986).
 - 22) H. Izawa, M. Arakawa, and T. Kondo, Disintegration by surfactants of egg yolk phosphatidylcholine vesicles stabilized with carboxymethylchitin. *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 243 (1986).
 - 23) A. Walter, C.J. Steer, and R. Blumenthal, Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 319 (1986).
 - 24) W. Hartmann and H.J. Galla, Binding of polylysine to charged bilayer membranes molecular organization of a lipid-peptide complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 474 (1978).
 - 25) J. Sunamoto, T. Sato, M. Hirota, K. Fukushima, K. Horatani, and K. Hara, A newly developed immunoliposome: an egg phosphatidylcholine liposome coated with pullulan bearing both a cholesterol moiety and an IgMs fragment. *Biochim. Biophys. Acta*, **898**, 323 (1987).
 - 26) E.O. Lee, J.G. Kim and J.D. Kim, The solubilization behavior of DOPE-immunoliposomes with IgG by added bile salts. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **20**, 135 (1990).
 - 27) G.M. Grass and J.R. Robinson, Sustained- and controlled-release drug delivery systems. In G.S. Banker and C.T. Rhodes (Eds.), *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, New York, 1990, Chap. 16.